



TITLE:

Analysis and application of microbial consortia involved in ammonification and nitrification for organic hydroponics(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Sakuntala, Saijai

CITATION:

Sakuntala, Saijai. Analysis and application of microbial consortia involved in ammonification and nitrification for organic hydroponics. 京都大学, 2016, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2016-09-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20009>

RIGHT:

許諾条件により本文は2017-09-22に公開

(続紙 1)

| | | | |
|---|---|----|------------------|
| 京都大学 | 博士（農学） | 氏名 | Sakuntala Saijai |
| 論文題目 | Analysis and application of microbial consortia involved in ammonification and nitrification for organic hydroponics (有機水耕栽培におけるアンモニア化成および硝酸化成に関与する微生物叢の解析と応用) | | |
| (論文内容の要旨) | | | |
| <p>土壌における有機成分の無機化は、土壌が作物に利用可能な栄養成分を供給するプロセスとして重要である。このプロセスの効率化には、有機成分の無機化機能を担う複合微生物系を理解する必要がある。近年、この複合微生物系を解析すべく、アンモニア化成や硝酸化成といった有機態窒素の無機化（硝化）に必須な複合微生物系を水系にて構築する手法が確立されるとともに、この手法を活用した有機水耕栽培技術の開発が進んでいる。本有機水耕栽培技術は、通気下にて有機態窒素の硝化に有効な微生物群を馴養する耕水工程と、植物の定植後、有機物の硝化と植物の栽培を同時に行う栽培工程で構成される。</p> <p>本研究では、耕水工程に着目し、硝化能に優れた土壌を微生物源として選抜し、馴養培養を繰り返すことで安定した硝化能を示す微生物群集を集積した。また、この集積過程の菌叢解析に基づき、集積した微生物群集から、新たな硝化菌の単離を行うとともに、モデル硝化微生物系を再構築できる可能性を示した。さらに有機水耕栽培技術の普及に向け、耕水工程ならびに栽培工程における病原性を有する可能性を持つ微生物種の動態を解析した。</p> <p>第一章では、硝化特性に優れた微生物源の選抜と硝化微生物群の集積を行うとともに、集積過程における窒素化合物と微生物叢の動態を解析した。0.5 g/Lの有機成分（カツオ煮汁）とpH安定化のためのCaCO₃（1.0 g/L）を含む水溶液に様々な微生物源（培養土、肥料、バーク堆肥、畑土壌など）を添加し、通気下におけるアンモニア、亜硝酸、硝酸の濃度変化を経時的に観察した。その結果、良好な硝化を実現する微生物源としてバーク堆肥を選抜した。バーク堆肥からの硝化菌群の集積過程では、アンモニアから亜硝酸を経て硝酸へ変化する窒素化合物動態が再現性良く観察された。続いて、Polymerase chain reaction/denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE)法を活用し、この集積過程における一般細菌、アンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌、真菌の菌叢推移を解析した。集積された微生物叢は土壌の微生物叢より単純化されており、集積に伴う微生物叢の変遷は窒素化合物の変遷と良い相関を示した。アンモニア生成時には、<i>Bacillus</i>属、<i>Pseudomonas</i>属、<i>Acinetobacter</i>属の一般細菌、<i>Leuconeurospora</i>属、<i>Hartmannella</i>属の真菌など、従属栄養微生物が主要微生物となっていた。亜硝酸蓄積時には多くの微生物が消失したが、<i>Bacillus</i>属、<i>Pseudomonas</i>属細菌は全硝化過程において存在していた。アンモニア酸化過程では、<i>Nitrosomonas</i>属アンモニア酸化細菌、<i>Cercomonas</i>属、<i>Mortierella</i>属の真菌が主要微生物となり、亜硝酸酸化過程では、<i>Nitrobacter</i>属亜硝酸酸化菌が主に観察された。以上の結果により、硝化に有用な微生物群集が、一般的な従属栄養微生物と硝化細菌からなる単純な微生物群により再構成されうる可能性が示された。</p> | | | |

第二章では、硝化微生物群の再構築に向け、*Nitrosomonas europaea* NBRC 14298 と *Nitrobacter winogradskyi* NBRC 14297 をそれぞれアンモニア酸化菌、亜硝酸酸化菌として用い、従属栄養細菌との共培養を行い、硝化特性を指標に硝化促進従属栄養細菌のスクリーニングを行った。その結果、*Bacillus badius* NBRC 15713 との共培養を行った際に効率的な硝化が観察された。これらの3菌種により構成されるモデル硝化微生物系（3菌系）は、C/N 比が10～50の種々の有機物（<0.2% (w/v)）を、pH 7～10 において効率的に硝化した。また、Real-time PCRによる解析から、本3菌系による硝化のアンモニア酸化ならびに亜硝酸酸化過程において、それぞれ *N. europaea*、*N. winogradskyi* が特異的に増殖していることがわかった。

第三章では、第一章で得た集積微生物群からの硝化菌、特に亜硝酸酸化菌の単離を試みた。硝化菌群を馴養する耕水工程に NaNO_2 (5 g/L) を添加し、亜硝酸酸化菌群の集積培養を行った。集積した微生物群を様々な濃度の NaNO_2 を含む2% グランガム培地にて播種し、コロニーを形成させた。さらに亜硝酸酸化酵素遺伝子の増幅が確認できたコロニーを単離し、上記の耕水工程と同じ NaNO_2 (5 g/L) を含む液体培地に植菌して亜硝酸酸化活性を確認した。その結果選抜された亜硝酸酸化活性を示すコロニーの16S rRNA遺伝子を解析したところ、本コロニーは脱窒細菌である *Alicyclophilus* 属細菌と亜硝酸酸化細菌である *Nitrobacter* sp. の2種の微生物より構成されるコロニーであった。

第四章では、有機水耕栽培技術の普及に向け、耕水工程ならびに栽培工程における病原性微生物種の動態を解析した。土壌（微生物源）と耕水工程中の硝化菌群におけるヒト病原性微生物種の有無を検定した結果、土壌、硝化菌群共に、一般的な土壌中に見られる *Staphylococcus aureus* と *Bacillus cereus* を同程度検出したが、その他の病原性微生物種は検出できなかった。また、耕水工程初期の水耕液に、*Escherichia coli* ならびに *Salmonella enterica* を接種しその消長を観察した。その結果、両菌は徐々に減少していき、*E. coli* は接種9日後、*S. enterica* は接種12日後に検出限界以下となった。また、トマト、チンゲンサイ、サラダナの栽培工程の水耕液に *E. coli* を接種し、その生残性を調べた。その結果、栽培開始と同時に接種した場合、4日後にはほぼ検出限界以下となった。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

人類の食糧の基盤を成す作物の安定的な生産は、健全な土壌の機能に支えられる。土壌における有機成分の無機化は作物栽培にとって重要な機能であるが、この機能を担う複合微生物系の理解は十分に進んでいない。本論文は、有機態窒素の無機化に関わる硝化微生物系の解明を通して、硝化機能を構成する土壌微生物の特定、制御、機能利用を試みたものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. 高い硝化能を示す微生物源としてバーク堆肥を選抜し、この微生物源から水系に硝化微生物群を集積した。この集積過程における窒素化合物と微生物叢の動態を解析し比較することで、硝化におけるアンモニア生成、アンモニア酸化、亜硝酸酸化に機能する微生物種を特定した。その結果、硝化に有用な微生物群集が、一般的な従属栄養微生物と硝化細菌からなる単純な微生物群により再構成される可能性を示した。
2. 従属栄養細菌としての*Bacillus badius*、硝化細菌としてのアンモニア酸化細菌*Nitrosomonas europaea*、亜硝酸酸化細菌*Nitrobacter winogradskyi*の3菌種からなるモデル硝化微生物系を構築した。本モデル硝化微生物系が良好な硝化能を有することを示すとともに、その硝化におけるアンモニア酸化、亜硝酸酸化過程において、それぞれ*N. europaea*、*N. winogradskyi*が特異的に増殖していることを明らかにした。
3. 水系に集積した硝化微生物群からの亜硝酸酸化菌の単離を試み、脱窒細菌である*Alicyclophilus*属細菌と亜硝酸酸化細菌である*Nitrobacter* sp. の2種の微生物より構成されるコロニーを得た。
4. 硝化微生物系を活用する有機水耕栽培技術の安全性評価の一環として、硝化微生物群の水系への集積過程ならびに作物栽培過程における病原性微生物種の動態を解析した。本研究で行われた有機水耕栽培では、一般土壌における作物栽培と比較して、同等あるいはそれ以下の病原性微生物種しか認められなかった。

以上のように、本論文は、土壌に存在する複雑な硝化菌群を水系に集積することを通して、その機能を担う微生物種を解明するとともに、数菌種からなるモデル硝化微生物系の再構築が可能であることを示した。また、これらの硝化微生物系を活用する有機水耕栽培技術に関して、微生物制御の観点からの安全性を検討したものであり、微生物生理学、土壌微生物学、微生物生態学、応用微生物学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成28年7月14日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）